

Difenyloamina

Oznaczanie w powietrzu środowiska pracy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej¹

Diphenylamine

Determining diphenylamine in workplace air with HPLC

mgr MARZENA BONCZAROWSKA

e-mail: marzena@imp.lodz.pl

dr SŁAWOMIR BRZEŹNICKI

e-mail: slawek@imp.lodz.pl

dr JAN GROMIEC

e-mail: jpgrom@imp.lodz.pl

Instytut Medycyny Pracy

im. prof. dr. med. Jerzego Nofera

91-348 Łódź

Numer CAS: 122-39-4

Słowa kluczowe: difenyloamina, metoda oznaczania, metoda chromatografii cieczowej, powietrze na stanowiskach pracy.

Keywords: diphenylamine, determination method, workplace air, HPLC.

Streszczenie

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano metodę oznaczania difenyloaminy (DPA) w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym lub fluorescencyjnym.

Metoda polega na: adsorpcji difenyloaminy na

filtrze z włókna szklanego nasączonego roztworem kwasu siarkowego, wyekstrahowaniu zatrzymanego związku za pomocą metanolu oraz analizie ekstraktu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem detektora spektrofotometrycznego lub spektrofluorymetrycznego. Metoda umożliwia oznaczanie difenyloaminy w

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego: „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowanego w latach 2011-2013 w zakresie służb państwowych przez Ministerstwo Pracy i Polityki Społecznej. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

zakresie stężeń $0,4 \div 16 \text{ mg/m}^3$ (dla próbki powietrza o objętości 100 l). Granica oznaczalności (LOQ) tej metody wynosi odpowiednio: $0,00026 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (FLD) i $0,02 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (UV-VIS).

Opracowaną metodę oznaczania difenyloaminy w powietrzu na stanowiskach pracy zapisano w postaci procedury analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

Summary

A new procedure has been developed for the assay of diphenylamine with high-performance liquid chromatography with a FLD or UV-VIS detector. The method is based on the adsorption of diphenylamine on glass fibre filters treated with sulfuric acid. The trapped diphenylamine is then extracted with methanol and the resulted solutions are analysed with high performance

chromatography with ultraviolet or spectrofluorimetric detection. The working range of the analytical method is $0.4 \div 16 \text{ mg/m}^3$ for a 100 L air sample. Limit of quantification: $0.00026 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (FLD) and $0.02 \text{ }\mu\text{g/ml}$ (UV-VIS). The developed method of determining diphenylamine has been recorded as an analytical procedure (see Appendix).

WPROWADZENIE

Difenyloamina (DPA) jest ciałem krystalicznym o charakterystycznym zapachu. Związek ten występuje w różnych barwach od bezbarwnej, białej do brązowej, a pod wpływem światła ulega odbarwieniu. Difenyloamina jest słabo rozpuszczalna w wodzie ($0,04 \text{ g/l}$ w temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$), natomiast dobrze rozpuszcza się w: acetonie, benzenie, etanolu, eterze, disiarczku węgla, kwasie octowym, acetonitrylu, metanolu, oktanolu i heksanie. Jest słabą zasadą, a z mocnymi kwasami tworzy sole rozpuszczalne w wodzie. Difenyloamina jest otrzymywana przez ogrzewanie do wysokiej temperatury aniliny lub aniliny z dodatkiem fenolu w obecności kwasu solnego jako katalizatora. Związek ten jest stosowany głównie jako półprodukt chemiczny. W przemyśle gumowym jest wykorzystywana jako antyozonant zapobiegający tworzeniu się spękań na powierzchni: gumy, kauczuków i tworzyw sztucznych, ponieważ difenyloamina, wchodząc w reakcje z ozonem tworzy warstwę izolującą.

W wyniku reakcji chemicznej difenyloaminy z siarką powstają fenotiazyny, które następnie są używane jako stabilizatory w produkcji, np.: tworzyw sztucznych, żywic epoksydowych i polichlorku winylu. Może być również wykorzystywana jako barwnik. Difenyloamina jest stosowana jako fungicyd i herbicyd, jak również jako przeciwutleniacz przedłużający świeży

wygląd roślin. W przemyśle farmaceutycznym difenyloamina jest wykorzystywana do produkcji leków stosowanych do zwalczania pasożytów u ludzi i zwierząt, a w chemii analitycznej do oznaczania związków utleniających (barwne reakcje w obecności kwasu siarkowego).

Do organizmu człowieka difenyloamina może dostawać się przez: bezpośredni kontakt ze skórą, drogą inhalacyjną lub pokarmową. Związek działa drażniąco na: oczy, skórę i błonę śluzową, może powodować podwyższenie tętna i ciśnienia krwi, a także wystąpienie methemoglobinemii. Nie stwierdzono ani działania teratogennego, ani embriotoksycznego czy szkodliwego wpływu difenyloaminy.

Na podstawie wyników badań nad rakotwórczym działaniem difenyloaminy, związek został zaklasyfikowany przez ACGIH do grupy A4, czyli do substancji nieklasyfikowanych jako czynniki rakotwórcze dla człowieka (ACGIH 2013).

Ze względu na zagrożenia dla zdrowia ludzi difenyloamina została sklasyfikowana (WE nr 1272/2008) jako substancja: wykazująca toksyczność ostrą przez wdychanie (kat. 3.), skórę (kat. 3.) i doustnie (kat. 3.), a także niebezpieczna dla środowiska wodnego. Difenyloaminie przypisano następujące zwroty zagrożenia: H301 – działa toksycznie po połknięciu, H311–

działa toksycznie w kontakcie ze skórą, H331 – działa toksycznie w następstwie wdychania, H371 – może powodować uszkodzenie narządów, H400 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, H410 – działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

W Polsce dotychczas nie ustalono wartości najwyższego dopuszczalnego stężenia (NDS) difenyloaminy w środowisku pracy. W 2013 r. Zespół Ekspertów Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy zaproponował przyjęcie stężenia 8 mg/m^3 za wartość NDS difenyloaminy (Bystry, Stetkiewicz 2013).

Difenyloamina jest oznaczana zwykle przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), (OSHA 1989; Rudell i in. 2005; Gilbert-Lopez i in. 2007; Lopez-Lopez i in. 2013). Do pobierania próbek powietrza do oznaczania stężeń difenyloaminy, jak i wielu innych amin aromatycznych, stosuje się filtry z włókna szklanego nasączone kwasem siarkowym (OSHA 1989).

Celem badań było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie difenyloaminy w powietrzu środowiska pracy w zakresie stężeń $0,4 \div 16 \text{ mg/m}^3$, czyli od 1/20 do 2 wartości NDS, zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie PN-EN 482: 2012.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Aparatura

W badaniach zastosowano chromatograf cieczowy firmy Waters, model Alliance wyposażony w: pompę poczwórną, termostat, detektor spektrofotometryczny (Waters PAD 2996) i spektrofluorymetryczny (Waters 2475), automatyczny dozownik próbek, termostat oraz komputer z programem sterowania i zbierania danych.

Analizy chromatograficzne wykonywano przy zastosowaniu kolumny analitycznej Supelcosil LC-18 250 x 3 mm o uziarnieniu $5 \mu\text{m}$ oraz Zorbax Eclipse XDB C-18 250 x 3 mm o uziarnieniu $5 \mu\text{m}$. Próbki powietrza pobierano za pomocą aspiratorów średnioprzepływowych firmy Gilian, model GilAir 3.

Odczynniki i materiały

W badaniach wykorzystano: difenyloaminę (Sigma-Aldrich), kwas siarkowy (POCh), kwas octowy (POCh), metanol (JT Baker), octan sodu (POCh), wodę do HPLC, filtry z włókna szklanego GF/A 37 mm (Whatman), suszarkę laboratoryjną (Memert), a także pipety automatyczne nastawne o pojemności $0,01 \div 0,1 \text{ ml}$ i $0,1 \div$

1 ml , szkło laboratoryjne (np.: pipety szklane jednomiarowe klasy A o pojemności: 1; 2,5 i 5 ml; kolby miarowe o pojemności: 1,10 i 25 ml i strzykawki do cieczy).

Ustalenie warunków oznaczania

Dobór warunków analizy chromatograficznej

Opisane w piśmiennictwie metody oznaczania difenyloaminy (DPA) w powietrzu z zastosowaniem techniki HPLC zakładają wykorzystanie do tego celu kolumny analitycznej wypełnionej złożem oktadecylovym (C-18), (OSHA 1989; Rudell i in. 2005). Wszystkie badania dotyczące: zakresu stosowania metody, odzysku, odzysku po aeracji, kalibracji, precyzji, trwałości próbek i roztworów oraz granic wykrywalności i oznaczalności wykonano przy zastosowaniu kolumny Supelcosil LC-18 250 x 3 mm, którą eluowano mieszaniną metanolu i wody w stosunku 7: 3 (v: v). Szczegółowe warunki analizy chromatograficznej podano w tabeli 1. Kolumnę Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 3 mm) stosowano w badaniach dotyczących selektywności oznaczeń difenyloaminy.

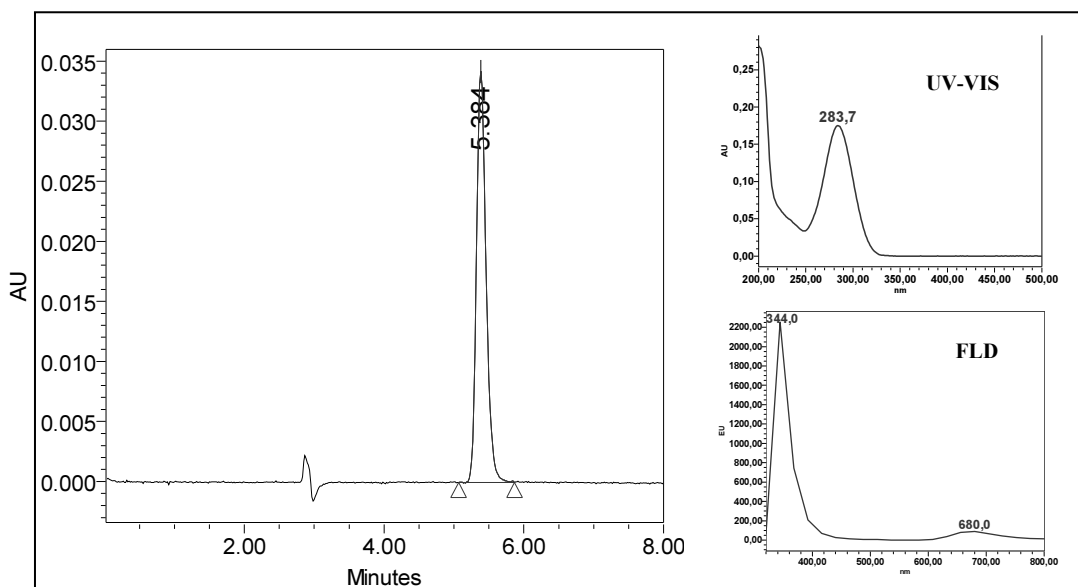
Tabela 1.

Warunki pracy chromatografu cieczowego z detektorem UV-VIS i FLD przy oznaczaniu difenyloaminy (DPA)

Kolumna analityczna	Supelcosil LC-18 250 x 3 mm, 5 μ m	
Faza ruchoma	metanol	woda
Program – izokratycznie (v:v)	80	20
Strumień objętości	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	λ 283 (UV-VIS) λ_{ex} – 285; λ_{em} – 680 (FLD)	
Objętość próbki	10 μ l	

Do ilościowego oznaczenia difenyloaminy zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS) i spektrofluorymetryczną (FLD). Celem określenia optymalnej długości fali analitycznej do oznaczania difenyloaminy, przygotowano metanolowy roztwór tego związku o stężeniu 80 μ g/ml. Roztwór poddano analizie chromatograficznej przy zastosowaniu chromatografu cieczowego wyposażonego w detektor diodowy umożliwiający uzyskanie widma analizowanej substancji oraz skaningowy detektor spektrofluorymetryczny umożliwiający zapis widma emisji przy danej długości fali wzbudzenia.

Badanie wykonano, analizując widmo difenyloaminy w zakresie 200 ÷ 500 nm (UV) oraz widmo emisji w zakresie 320 ÷ 800 nm przy długości fali wzbudzenia λ – 285 nm (FLD). Wynik badania przedstawiono na rysunku 1. Analiza widma UV badanego związku pozwala na stwierdzenie, iż optymalną do oznaczeń ilościowych długością fali analitycznej jest λ = 283 nm. Przy zastosowaniu detektora fluorymetrycznego maksymalną czułość oznaczeń można uzyskać przy długości fali emisji λ – 344 nm. Jednak wystarczającą czułość, z punktu widzenia opracowanej metody, można uzyskać przy zastosowaniu długości fali emisji λ – 680 nm.



Rys. 1. Chromatogram difenyloaminy (DPA) i jej widmo w UV w zakresie 200 ÷ 500 nm oraz widmo emisji zarejestrowane przy długości fali wzbudzenia λ = 283 nm. Kolumna Supelcosil LC-18

Dobór warunków pobierania próbek powietrza

Z dostępnych danych piśmiennictwa wynika, iż do pobierania próbek powietrza do oznaczania stężeń difenyloaminy, jak i wielu innych amin aromatycznych, stosuje się filtry z włókna szklanego nasączone kwasem siarkowym (OSHA 1989), co postanowiono zastosować w niniejszej pracy. Do pobierania próbek powietrza zastosowano filtry z włókna szklanego Whatman GF/A 37 mm nasączone 0,5 ml kwasu siarkowego o stężeniu 0,13 mol/l. Filtry po naniesieniu kwasu siarkowego suszono w temperaturze 100 °C przez 60 min i przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach.

Celem zbadania odzysku difenyloaminy z filtrów przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 100 µl metanowych roztworów difenyloaminy o stężeniach: 0,4; 1,6 i 8 mg/ml. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do wial o pojemności 8 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji na wytrząsarce za pomocą 5 ml metanolu. Ekstrakty rozcieńczano dziesięciokrotnie i poddawano analizie chromatograficznej. Wyniki badań przedstawiono w tabelach 2. i 3. Współczynniki odzysku difenyloaminy ekstrahowanej z badanych filtrów dla trzech analizowanych stężeń wynoszą odpowiednio: 85,9; 90,7 i 94,2 (detektor UV-VIS) oraz 85,4; 90,8 i 96,3% (detektor FLD). Średnia wartość współczynnika odzysku wynosi około 90%.

Tabela 2.

Badanie odzysku difenyloaminy (DPA) pobranej na filtry szklane nasączone kwasem siarkowym przy zastosowaniu detektora UV-VIS

Medium pochłaniające	Ilość DPA naniesiona na filtr, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr szklany nasączony roztworem kwasu siarkowego	40	18 620,8	15 888,2	86,5	85,9
		18 365,1; 18 125,9	15 759,3	85,8	
			15 823,9	86,1	
			15 764,5	85,8	
			15 729,7	85,6	
			15 659,1	85,2	
			<i>S</i> 0,4		
			<i>CV</i> 0,5		
	160	71 726,1	64 077,1	89,0	90,6
		72 335,9	64 098,6	89,0	
		71 947,6	66 059,6	91,8	
			66 850,0	92,8	
		65 759,4	91,3		
		64 793,4	90,0		
		<i>S</i> 1,6			
		<i>CV</i> 1,7			
800	353 274,3	346 847,9	95,9	94,2	
	363 660,6	347 016,7	96,0		
	364 788,1	337 543,1	93,4		
		338 669,8	93,7		
		339 980,4	94,0		
		334 406,2	92,5		
		<i>S</i> 5,1			
		<i>CV</i> 5,6			
Średni współczynnik odzysku, <i>Śr.</i> , %			90,2		
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>			4,5		
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %			5,0		

Tabela 3.
Badanie odzysku difenyloaminy (DPA) pobranej na filtry szklane nasączone kwasem siarkowym przy zastosowaniu detektora FLD

Medium pochłaniające	Ilość DPA naniesiona na filtr, µg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr szklany nasączony roztworem kwasu siarkowego	40	6 415 732,6	5 345 420,3	86,6	85,4
		6 039 917,3	5 325 195,5	86,3	
		6 051 753,2	5 102 148,6	82,7	
			5 368 945,5	87,0	
			5 285 479,1	85,7	
			5 196 159,8	84,2	
			<i>S</i> 1,7		
			<i>CV</i> 1,9		
	160	23 941 768,8	21 732 915,2	91,0	90,8
		23 913 086,6	21 842 529,6	91,5	
23 7581 45,5		21 882 373,3	91,7		
		22 006 748,4	92,2		
		21 659 092,6	90,7		
		20 936 504,4	87,7		
		<i>S</i> 1,6			
		<i>CV</i> 1,8			
800	114 564 942,2	114 857 442,4	98,4	96,3	
	117 233 422,0	115 057 883,0	98,6		
	118 231 221,3	112 214 122,2	96,2		
		110 473 108,8	94,7		
		110 228 046,6	94,5		
		111 054 959,3	95,2		
		<i>S</i> 5,1			
		<i>CV</i> 5,6			
Średni współczynnik odzysku, \bar{S}_r , %				90,8	
Odchylenie standardowe, <i>SD</i>				5,4	
Współczynnik zmienności, <i>CV</i> , %				6,0	

W celu sprawdzenia możliwości powstania strat analizowanej substancji w wyniku przepuszczania powietrza, wykorzystano trzyczęściowe głowice do pobierania próbek powietrza umożliwiające zainstalowanie drugiego filtra. Przygotowano trzy serie po sześć filtrów szklanych nasączonych 0,5 ml kwasu siarkowego o stężeniu 0,13 mol/l, na które naniesiono po 100 µl metanolewych roztworów difenyloaminy o stężeniach: 0,4; 1,6 i 8 mg/ml. W pierwszej części głowicy umieszczono filtr z naniesionym roztworem wzorcowym, a w drugiej części głowicy umieszczono filtr bez wzorca. Filtry podłączono do aspiratorów średnioprzepływowych i przez okres 100 min przepuszczano przez nie powietrze ze strumieniem objętości 1 l/min. Po tym czasie zarówno filtry z naniesionym roztworem wzorcowym, jak i filtry bez wzorców przeniesiono

do wial o pojemności 8 ml i poddano 30-minutowej ekstrakcji na wytrząsarce za pomocą 5 ml metanolu. Ekstrakty rozcieńczano dziesięciokrotnie i poddawano analizie chromatograficznej. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wykazano (tab. 4. i 5.), że przyjęty sposób pobierania próbek powietrza nie powoduje istotnych ilościowych strat difenyloaminy naniesionej na filtr. Wartości odzysku dla trzech analizowanych stężeń wynoszą odpowiednio: 82,5; 84,0 i 97,6% (detektor UV-VIS) oraz 82,1; 82,1 i 97,7% (detektor FLD). Średnia wartość współczynnika odzysku próbek poddanych aeracji wynosi około 87,0%. Wyniki analiz filtrów bez naniesionego wzorca wskazują, że straty spowodowane przepuszczaniem powietrza przez filtry wynoszą średnio około 3,3% (0,1 ÷ 5,6% – UV-VIS) oraz 4,3% (1,2 ÷ 6,3% – FLD).

Tabela 4.

Badanie wpływu przepuszczania 100 l powietrza przez próbnik na odzysk pochłoniętych substancji przy zastosowaniu detektora UV-VIS

Medium pochłaniające	Ilość DPA naniesiona na filtr, μg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr szklany nasączony roztworem kwasu siarkowego	40	16 290,4	14 013,1	86,8	82,5
		16 106,5	13 056,2	80,8	
		16 065,6	12 518,3	77,5	
			11 903,1	73,7	
			14 485,1	89,7	
			13 966,8	86,5	
				S 6,2	
				CV 7,5	
	160	60 495,2	52 765,1	86,3	84,0
		60 889,6	54 688,6	89,5	
		62 016,7	51 538,0	84,3	
			50 664,8	82,9	
		49 461,3	80,9		
		48 954,6	80,1		
			S 3,5		
			CV 4,2		
800	311 279,3	290 827,0	91,3	97,6	
	321 984,9	324 167,6	101,7		
	322 387,8	319 064,7	100,2		
		314 493,8	98,7		
		312 652,2	98,2		
		303 987,3	95,5		
			S 3,7		
			CV 3,8		
Średni współczynnik odzysku, \bar{S}_r , %				88,0	
Odchylenie standardowe, SD				8,3	
Współczynnik zmienności, CV , %				9,4	

Tabela 5.

Badanie wpływu przepuszczania 100 l powietrza przez próbnik na odzysk pochłoniętych substancji przy zastosowaniu detektora FLD

Medium pochłaniające	Ilość DPA naniesiona na filtr, μg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
Filtr szklany nasączony roztworem kwasu siarkowego	40	4 491 416,3	3 618 531,3	82,6	82,1
		4 430 752,1	3 525 840,0	80,5	
		4 218 101,8	3 790 327,2	86,5	
			3 513 242,3	80,2	
			3 446 323,4	78,7	
			3 673 143,2	83,9	
				S 2,8	
				CV 3,5	
	160	16 540 351,8	13 827 090,4	83,3	82,1
		16 657 490,5	13 995 357,0	84,3	
		16 600 761,9	13 840 127,2	83,4	
			12 897 725,1	77,7	
		13 272 485,9	80,0		
		13 930 914,6	83,9		
			S 1,6		
			CV 1,8		

cd. tab. 5.

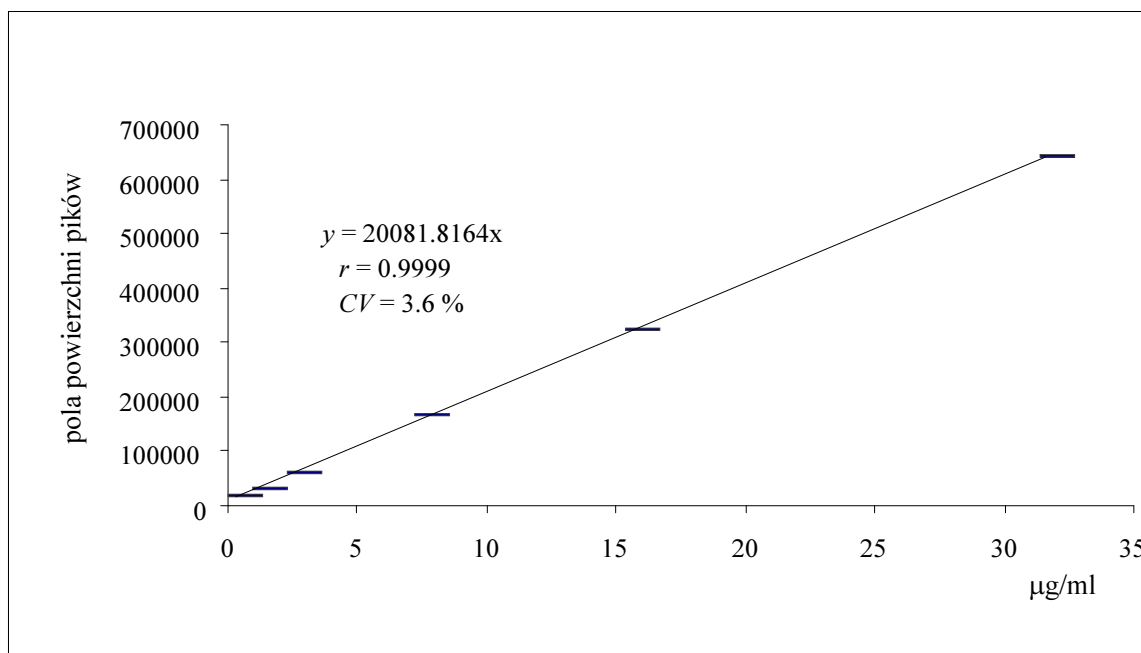
Medium pochłaniające	Ilość DPA naniesiona na filtr, μg	Pole powierzchni pików		Współczynnik odzysku, %	Średnia wartość współczynnika odzysku, %
		roztwór kontrolny	ekstrakt		
	800	83 704 407,4 88 502 965,1 88 784 501,1	79 160 872,4 89 534 054,6 87 195 861,9 85 958 650,8 85 402 210,7 82 875 519,1	91,0 102,9 100,2 98,8 98,2 95,3	97,7
				S 5,1 CV 5,6	
Średni współczynnik odzysku, \bar{S}_r , %				90,8	
Odchylenie standardowe, SD				5,4	
Współczynnik zmienności, CV , %				6,0	

Kalibracja i precyzja

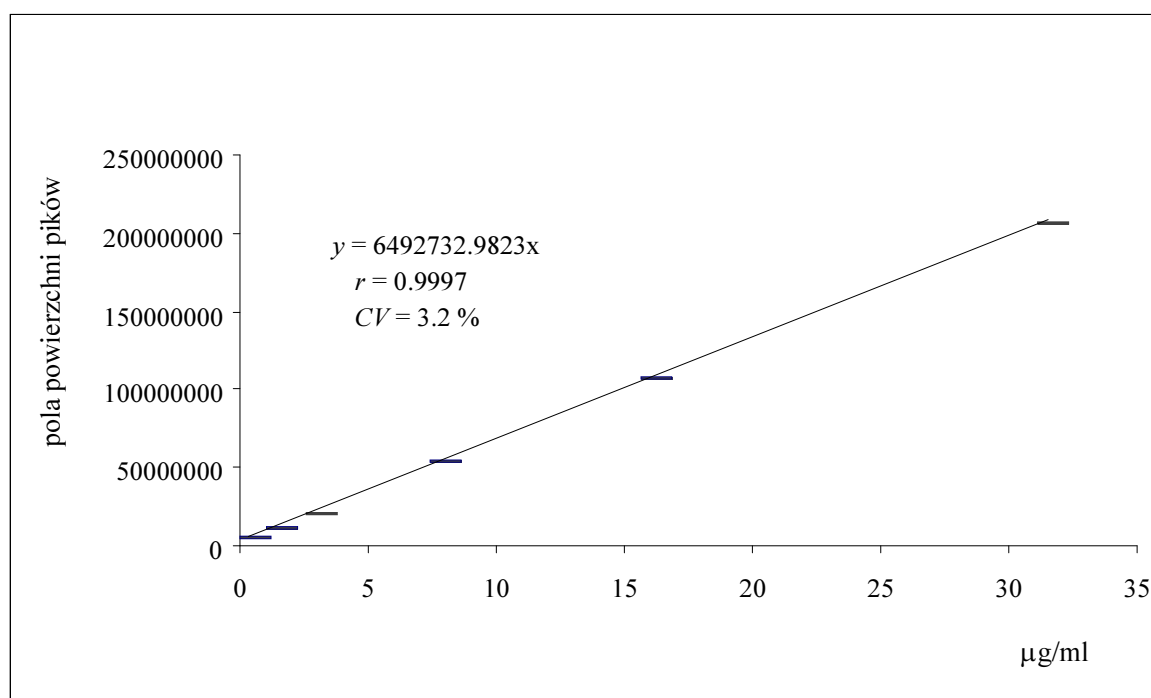
Celem określenia zakresu roboczego i liniowości metody naniesiono mikropipetą po 100 μl metanowych roztworów difenyloaminy o stężeniach: 0; 0,4; 0,8; 1,6; 4,0; 8,0 i 16,0 mg/ml, na trzy serie po siedem filtrów nasączonych 0,5 ml kwasu siarkowego o stężeniu 0,13 mol/l. Po odparowaniu rozpuszczalnika filtry przeniesiono do wial o pojemności 8 ml, dodano 5 ml metanolu i poddano 30-minutowej ekstrakcji na wytrząsarce. Ze względu na wysoki sygnał fluorescencji z detektora FLD eluaty rozcieńczano dziesięciokrotnie, przenosząc 100 μl roztworu do kolb miarowych o pojemności 1 ml i po uzupełnieniu do kreski metanolem i wymieszaniu przeno-

szono następnie do wial o pojemności 2 ml i poddawano analizie chromatograficznej. Wyniki badania liniowości metody przedstawiono graficznie na rysunku 2. (zastosowanie detektora UV-VIS) i na rysunku 3. (zastosowanie detektora FLD).

Z przedstawionych danych wynika, iż zależność odpowiedzi detektora od stężenia difenyloaminy ma charakter liniowy w zakresie 0,8 ÷ 32 $\mu\text{g/ml}$. Niezależnie od rodzaju zastosowanego detektora, współczynnik korelacji „ r ” w analizowanym zakresie stężeń jest równy 0,999, a wyrażony w procentach błąd względny CV zawiera się w granicach 3,2 ÷ 3,6%.



Rys 2. Krzywa wzorcową difenyloaminy (DPA) z zastosowaniem detektora UV-VIS



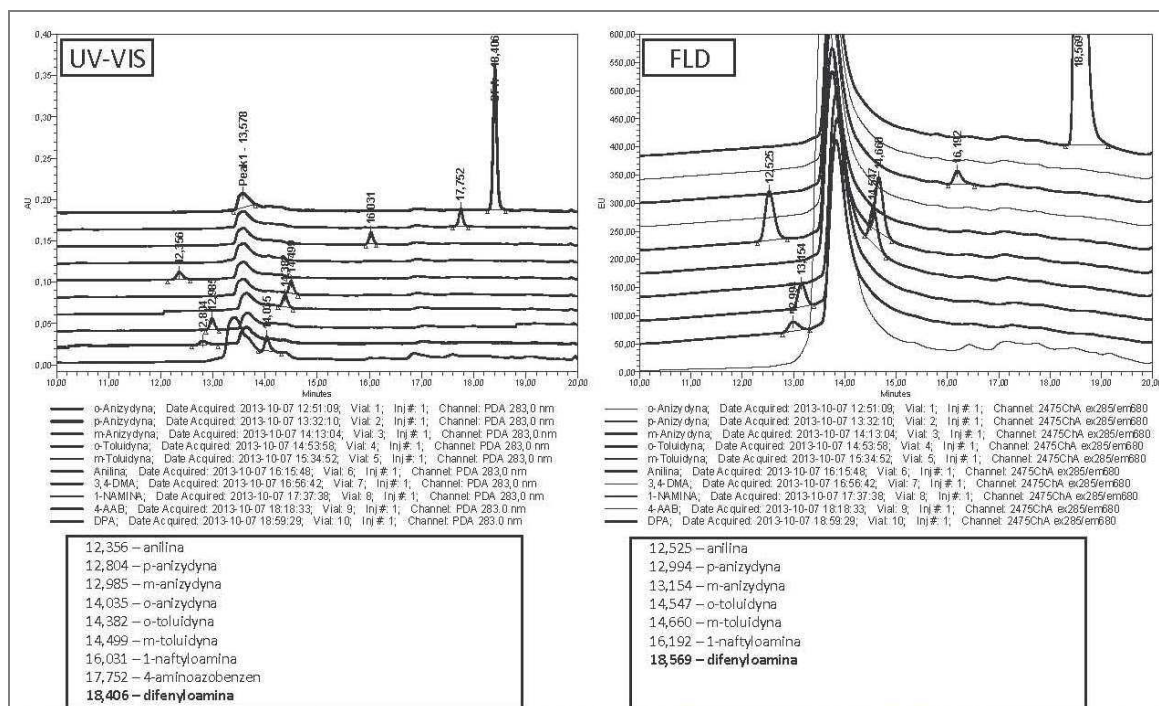
Rys. 3. Krzywa wzorcowa difenyloaminy (DPA) z zastosowaniem detektora FLD

Celem zbadania zgodności wyników przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia, przygotowano trzy metanolewe roztwory difenyloaminy o stężeniach: 0,8; 3,2 i 16 µg/ml, a następnie każdy z roztworów nastrzyknięto dziesięciokrotnie. Względne odchylenie standardowe rozrzutów uzyskanych wyników w stosunku do wartości średnich dla trzech analizowanych stężeń przy wykorzystaniu detektora UV-VIS nie przekracza 1,5%, a w przypadku detektora FLD – 1,4%.

Wyznaczanie granic wykrywalności i oznaczalności

Badanie granicy wykrywalności i oznaczalności difenyloaminy przeprowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w opracowaniu *Dobeckiego*

(*Dobecki* 2004), obliczając odchylenie standardowe sygnału tła, a następnie granicę wykrywalności (*GW*) i granicę oznaczalności (*GO*). Wyniki analiz wykonanych celem określenia granic wykrywalności i oznaczalności przedstawiono w tabelach 6. i 7. Obliczone wartości *GW* i *GO* wynoszą odpowiednio: 0,006 i 0,02 µg/ml (detektor UV-VIS) oraz 0,00008 i 0,00026 (detektor FLD).



Rys. 4. Możliwość selektywnego oznaczenia difenylaminy (DPA), (RT-18,406) w obecności amin aromatycznych przy zastosowaniu kolumny Zorbax Eclipse XDB i elucji gradientowej mieszaniną acetonitryl: bufor octanowy

Tabela 6.

Wyznaczanie granicy wykrywalności (*GW*) i oznaczalności (*GO*) difenylaminy (DPA) przy zastosowaniu detektora UV-VIS

Pole powierzchni pików										
411,56	472,69	367,17	421,17	441,86	452,24	497,69	386,86	429,91	469,54	
Średnie pole powierzchni, $n = 10$										435,07
Odchylenie standardowe, SD										40,24
Współczynnik zmienności, $CV, \%$										9,25
Granica wykrywalności $GW, X_{gw}, \mu\text{g/ml}$										0,006
Granica oznaczania ilościowego $GO, X_{go}, \mu\text{g/ml}$										0,020

Tabela 7.

Wyznaczanie granicy wykrywalności (*GW*) i oznaczalności (*GO*) difenylaminy (DPA) przy zastosowaniu detektora FLD

Pole powierzchni pików										
3478,5	3176,3	3583,8	3150,2	3211,7	3459,1	3540,9	3489,8	3571,7	3274,2	
Średnie pole powierzchni, $n = 10$										3393,6
Odchylenie standardowe, SD										171,3
Współczynnik zmienności, $CV, \%$										5,05
Granica wykrywalności $GW, X_{gw}, \mu\text{g/ml}$										0,00008
Granica oznaczania ilościowego $GO, X_{go}, \mu\text{g/ml}$										0,00026

Badanie trwałości pobranych próbek powietrza

Celem zbadania trwałości roztworu difenyloaminy przygotowano w metanolu roztwór tego związku o stężeniu 1,6 mg/ml. Roztwór przechowywano w chłodziarce, w szczelnie zamkniętej wiali przez trzy tygodnie. Po tym czasie z badanego roztworu przygotowano trzy rozcieńczenia (32 µg/ml), które poddano analizie chromatograficznej. Wyniki porównano z wynikami analiz metanolowego roztworu difenyloaminy o tym samym stężeniu, który przygotowano w dniu analizy. Na podstawie otrzymanych wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że roztwór difenyloaminy, przechowywany w szczelnie zamkniętych naczyniach w chłodziarce, jest trwały przez co najmniej trzy tygodnie.

Celem zbadania trwałości próbek difenyloaminy pobranej na filtr nasączony kwasem siarkowym przygotowano trzy serie po sześć filtrów, na które naniesiono po 100 µl metanolowych roztworów difenyloaminy o stężeniach: 0,4; 1,6 i 8 mg/ml. Filtry przeniesiono do wial o pojemności 8 ml, szczelnie zamknięto, a następnie umieszczano w chłodziarce. Difenyloaminę po pięciu, dziesięciu i dwudziestu dniach przechowywania, ekstrahowano z filtrów za pomocą 5 ml metanolu przez 30 min na wytrząsarce, następnie ekstrakty rozcieńczano dziesięciokrotnie i podda-

wano analizie chromatograficznej, porównując uzyskane wyniki z wynikami analiz eluatów difenyloaminy przygotowanych w dniu analizy. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że próbki difenyloaminy przechowywane w hermetycznych pojemnikach w chłodziarce, są trwałe przez okres co najwyżej dwudziestu dni. Średni współczynnik odzysku dla trzech stężeń po dwudziestu dniach przechowywania wynosi 92% (stosowanie detektora UV-VIS) i 91% (stosowanie detektora FLD).

Selektywność

Selektywność oznaczeń difenyloaminy (DPA) sprawdzano w obecności takich innych amin, jak: anilina, 1-naftyloamina, *o*-toluidyna, *m*-toluidyna, 4-aminoazobenzen, *o*-anizydyna, *m*-anizydyna, *p*-anizydyna i 3,4-dimetyloamina. W tym celu przygotowano acetonitrylowe roztwory amin o stężeniu 100 µg/ml i każdy roztwór poddano analizie chromatograficznej, wykorzystując warunki rozdziału podane w tabeli 8. Jak wynika z rysunku 4., zastosowanie do analizy difenyloaminy: kolumny analitycznej Zorbax Eclipse XDB, elucji gradientowej oraz dobranych optymalnych długości fal analitycznych, pozwala na selektywne oznaczenie tego związku także w obecności innych amin aromatycznych.

Tabela 8.

Warunki pracy chromatografu cieczowego zapewniające możliwość selektywnego oznaczenia difenyloaminy (DPA) w obecności innych amin aromatycznych

Kolumna analityczna	Zorbax Eclipse XDB C-18 250 x 3mm; 5 µm	
Faza ruchoma	acetonitryl	bufor octanowy 0,1 mol/l pH 4,6
Program – gradient: min	A	B
0	10	90
2	10	90
15	100	0
25	100	0
30	10	90
Strumień objętości	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	λ 283 (UV-VIS) λ _{ex/em} 285/680 (FLD)	
Objętość próbki	10 µl	

Walidacja

Walidację metody oznaczania difenyloaminy w powietrzu na stanowiskach pracy przeprowadzono zgodnie z wymaganiami zawartymi w normie europejskiej PN-EN 482:2012.

Wyznaczono następujące parametry walidacyjne:

- zakres pomiarowy metody wynosi od 1/20 do 2 proponowanej wartości NDS
- krzywa kalibracyjna charakteryzująca się dużą wartością współczynnika korelacji ($R = 0,999$), co świadczy o liniowości wskazań detektorów chromatografu cieczowego w badanym zakresie stężeń.

Wyznaczono: granice wykrywalności i oznaczalności difenyloaminy, całkowitą precyzję i względną niepewność całkowitą metody.

Walidacja metody potwierdziła jej przydatność do oznaczania difenyloaminy w powietrzu na stanowiskach pracy z zastosowaniem wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym lub fluorescencyjnym.

Wyznaczone parametry walidacyjne zawarto w Procedurze analitycznej, którą zamieszczono w Załączniku.

PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano czułą i selektywną metodę oznaczania difenyloaminy (DPA) w powietrzu na stanowiskach pracy z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS) i/lub spektrofluorymetryczną (FLD).

Ustalono sposób pobierania próbek powietrza:

- filtry z włókna szklanego nasączone 0,5 ml kwasu siarkowego o stężeniu 0,13 mol/l; zatrzymany na filtrze związek jest desorbowany za pomocą metanolu; średnia wartość współczynnika odzysku difenyloaminy z filtra wynosi ponad 90%
- próbki difenyloaminy pobrane na wymienione filtry i przechowywane w chłodziarce są trwałe przez co najwyżej dwadzieścia dni.

Dobrano parametry chromatograficznego

oznaczania:

- do oznaczania difenyloaminy można stosować kolumny Supelcosil LC-18 250 x 3 mm o uziarnieniu 5 μm i Zorbax Eclipse XDB C-18 250 x 3 mm, jednakże w przypadku obecności w badanym powietrzu również innych amin aromatycznych zalecane jest stosowanie drugiej z wymienionych kolumn, eluowanej mieszaniną acetonitrylu i buforu octanowego, co pozwala na selektywne oznaczenie difenyloaminy.

Opracowana metoda oznaczania difenyloaminy może być wykorzystywana przez laboratoria higieny pracy i stacje sanitarno-epidemiologiczne do wykonywania pomiarów stężeń tej substancji w powietrzu na stanowiskach pracy, w celu oceny narażenia pracowników i oceny stwarzanego ryzyka zawodowego.

PIŚMIENNICTWO

ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists (2013) Threshold limit values for chemicals substances and physical agents. Biological Exposure Indices. Cincinnati.

Bystry K., Stetkiewicz J. (2013) Difenyloamina. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych

poziomów narażenia zawodowego. Zespół Ekspertów ds. Czynników Chemicznych Międzyresortowej Komisji ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych dla Zdrowia w Środowisku Pracy. Łódź.

Dobecki M. (2004) Zapewnienie jakości analiz che-

micznych. Wyd. 3., popr. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.

Gilbert-Lopez B. i in. (2007) Analyses of pesticide residues in fruit-based baby food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2059–2071.

HSDB, Hazardous Substances Data Bank (2013). *N,N*-diphenylamine [<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~zv4DBQ:1>].

Lopez-Lopez M. i in. (2013) Diphenylamine and derivatives as predictors of gunpowder age by means of HPLC and statistical models. *Talanta*, 103, 214–220.

Occupational Safety & Health Administration (1989) OSHA Index of Sampling & Analytical Methods # 78 Diphenylamine/*n*-Isopropylaniline [<http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/organic/org028/org028.html>].

PN-EN 482:2012 Powietrze na stanowiskach pracy. Wymagania ogólne dotyczące charakterystyki procedur pomiarów czynników chemicznych.

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek powietrza – Zasady pobierania próbek powietrza i interpretacji wyników.

Rudell D.L., Mattheis J.P., Fellman J.K. (2005) Evaluation of diphenylamine derivatives in apple peel using gradient reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet – visible absorption and atmospheric pressure chemical ionization mass selective detection. *J. Chromatogr A.* Jul. 22, 1081(2), 202–9.

WE 1272/2008 Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 1272/2008 z dnia 16.12. 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniającego i uchylającego dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (zwanego rozporządzeniem GHS). *Dz. Urz. Unii Europejskiej* z dnia 31.12.2008 r. (L 353).

PROCEDURA ANALITYCZNA OZNACZANIA DIFENYLOAMINY W POWIETRZU ŚRODOWISKA PRACY METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. Zakres stosowania metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze stosuje się do oznaczania difenyloaminy (DPA), (CAS: 122-39-4) w powietrzu na stanowiskach pracy. Metodę stosuje się podczas badania warunków sanitarnohigienicznych w zakładach pracy.

W przypadku współwystępowania w badanym powietrzu innych związków organicznych należy sprawdzić, czy w warunkach wykonania oznaczania nie mają one takich samych czasów retencji jak difenyloamina.

Najmniejsze stężenie difenyloaminy, jakie można oznaczyć w warunkach pobierania próbek powietrza i wykonania oznaczania opisanych w metodzie, wynosi $0,4 \text{ mg/m}^3$.

2. Powołania normatywne

PN-Z-04008-7 Ochrona czystości powietrza – Pobieranie próbek – Zasady pobierania próbek powietrza w środowisku pracy i interpretacji wyników.

3. Zasada metody

Metoda polega na adsorpcji difenyloaminy na filtrze z włókna szklanego nasączonego roztworem kwasu siarkowego, wyekstrahowaniu zatrzymanego związku za pomocą metanolu oraz chromatograficznym oznaczaniu ekstraktu przy zastosowaniu detektora spektrofotometrycznego lub spektrofluorymetrycznego.

4. Wytyczne ogólne

4.1. Czystość odczynników

Do analizy, o ile nie zaznaczono inaczej, należy stosować odczynniki i substancje wzorcowe o stopniu czystości co najmniej cz.d.a.

4.2. Dokładność ważenia

Substancje stosowane w analizie należy ważyć z dokładnością do $0,0002 \text{ g}$.

4.3. Postępowanie z substancjami toksycznymi

Wszystkie czynności, podczas których używa się substancji wzorcowych, należy wykonywać pod sprawnie działającym wyciągiem laboratoryjnym.

Zużyte roztwory i odczynniki należy gromadzić w przeznaczonych do tego celu pojemnikach i przekazywać do zakładów zajmujących się ich unieszkodliwianiem.

5. Odczynniki, roztwory i materiały

5.1. Difenyloamina

Stosować według punktu 4.

5.2. Kwas octowy

Stosować kwas octowy lodowaty.

5.3. Kwas siarkowy

Stosować kwas siarkowy 96-procentowy o gęstości $d = 1,84 \text{ g/cm}^3$

5.4. Metanol do HPLC

Stosować metanol o czystości do HPLC.

5.5. Octan sodu

Stosować octan sodu wg punktu 4.

5.6. Roztwór buforu octanowego

W celu otrzymania buforu octanowego o stężeniu $0,1 \text{ mol/l}$ i $\text{pH } 4,6$ należy zmieszać 245 ml roztworu octanu sodu otrzymanego przez rozpuszczenie $8,2 \text{ g}$ octanu sodu wg punktu 5.5. w 1000 ml wody oraz 255 ml roztworu kwasu octowego otrzymanego przez rozpuszczenie $5,8 \text{ ml}$ kwasu octowego wg punktu 5.2. w 1000 ml wody. Kolbę uzupełnić do kreski wodą wg punktu 5.10. i wymieszać.

5.7. Roztwór kwasu siarkowego

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml , częściowo wypełnionej wodą, odmierzyć $0,72 \text{ ml}$ kwasu siarkowego wg punktu 5.3., wymieszać i uzupełnić

wodą do kreski. Stężenie tak przygotowanego roztworu kwasu siarkowego wynosi 0,13 mol/l.

5.8. Roztwór wzorcowy podstawowy difenyloaminy

Odważyć dokładnie 400 mg difenyloaminy wg punktu 5.1., przenieść do kolby miarowej o pojemności 25 ml i rozpuścić w metanolu wg punktu 5.4.; 1 ml tak przygotowanego roztworu zawiera 16,0 mg difenyloaminy.

5.9. Roztwory wzorcowe robocze difenyloaminy

Do siedmiu kolb pomiarowych o pojemności 10,0 ml odmierzyć za pomocą pipet wg punktów 6.6. i 6.7. odpowiednio: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 5,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego wg punktu 5.8. i uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.4. Stężenia difenyloaminy w tak przygotowanych roztworach wynoszą odpowiednio: 0; 0,4; 0,8; 1,6; 4,0; 8,0 i 16,0 mg/ml.

5.10. Woda do HPLC

Stosować wodę o czystości do HPLC.

6. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

6.1. Chromatograf cieczowy

Stosować chromatograf cieczowy wyposażony w detektor spektrofotometryczny umożliwiający wykonanie oznaczeń przy długości fali 283 nm lub detektor spektrofluorymetryczny umożliwiający wykonanie analizy przy długości fali wzbudzenia i emisji odpowiednio 285 i 680 nm.

6.2. Filtry z włókna szklanego

Stosować filtry z włókna szklanego o średnicy 37 mm i średnicy porów 1,6 μm .

Na każdy filtr nanieść za pomocą pipety po 0,5 ml roztworu kwasu siarkowego wg punktu 5.7. Filtry suszyć przez okres 1 h w temperaturze 100 °C. Gotowe filtry przechowywać w hermetycznie zamkniętych pojemnikach.

6.3. Kolumna chromatograficzna

Stosować kolumnę chromatograficzną stalową o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 3 mm wypełnioną fazą oktadecylową (C-18) o średnicy ziaren 5 μm .

6.4. Kolby miarowe

Stosować kolby miarowe o pojemności: 1,0; 10; 25 i 1000 ml.

6.5. Naczynka szklane (wiale)

Stosować wiale o pojemności 2 i 8 ml.

6.6. Pipety automatyczne nastawne

Stosować pipety automatyczne nastawne o pojemności: 0,010 ÷ 0,1 i 0,1 ÷ 1 ml.

6.7. Pipety szklana

Stosować pipety szklane jednomiarowe klasy A o pojemności: 1; 2,5 i 5 ml.

6.8. Pompa ssąca

Stosować pompę ssącą z przepływomierzem, umożliwiającą pobranie powietrza ze stałym strumieniem objętości według punktu 7.

6.9. Wyrząsarka rotacyjna

Stosować wyrząsarkę rotacyjną.

7. Pobieranie próbek powietrza

Podczas pobierania próbek powietrza należy stosować zasady zawarte w normie PN-Z-04008-07.

Za pomocą pompy wg punktu 6.8. przepuścić przez zestaw złożony z dwóch filtrów wg punktu 6.2. około 100 l powietrza ze stałym strumieniem objętości do 1 l/min. Pobrane próbki powietrza zabezpieczyć i do czasu analizy przechowywać w chłodziarce. Tak przechowywane próbki są trwałe przez okres co najmniej trzech tygodni.

8. Warunki pracy chromatografu

Należy tak dobrać skład fazy ruchomej, aby zapewnić selektywny rozdział difenyloaminy od substancji współwystępujących. W przypadku stosowania kolumny chromatograficznej wg punktu 6.3. oznaczenie można wykonać przy zastosowaniu warunków podanych w tabeli 1. Podane warunki należy traktować jako warunki przykładowe.

W przypadku współwystępowania substancji interferujących należy tak dobrać warunki rozdziału chromatograficznego, by zapewnić selektywne oznaczenie difenyloaminy.

Tabela 1.
Przykładowe warunki pracy chromatografu cieczonego

Kolumna analityczna	Zorbax Eclipse XDB C-18 250 x 3mm; 5 µm	
Faza ruchoma	Metanol	Bufor octanowy 0,1 mol/l pH 4,6
Program – gradient: min	A	B
0	10	90
2	10	90
15	100	0
25	100	0
30	10	90
Strumień objętości	0,4 ml/min	
Temperatura kolumny	30 °C	
Długość fali analitycznej	λ 283 (UV-VIS) λ _{ex/em} 285/680 (FLD)	
Objętość próbki	10 µl	

9. Sporządzanie krzywej wzorcowej

Na siedem filtrów wg punktu 6.2. nanieść pipetą automatyczną wg punktu 6.6. po 0,1 ml roztworów wzorcowych roboczych difenyloaminy wg punktu 5.9. Po odparowaniu rozpuszczalnika, przenieść filtry do naczynek o pojemności 8 ml i poddać 30-minutowej ekstrakcji na wytrząsarce rotacyjnej za pomocą 5 ml metanolu. Przenieść pipetą automatyczną wg punktu 6.6. 0,1 ml ekstraktu do kolby miarowej o pojemności 1 ml wg punktu 6.4., następnie uzupełnić do kreski metanolem wg punktu 5.4. i po dokładnym wymieszaniu poddać analizie chromatograficznej. Sporządzić krzywą wzorcową, odkładając na osi odciętych zawartość difenyloaminy na filtrze (w miligramach), a na osi rzędnych – wartość pola powierzchni (wysokości) pików tego związku. Dopuszcza się automatyczne integrowanie danych oraz sporządzanie krzywej wzorcowej.

10. Wykonanie oznaczania

Każdy filtr należy ekstrahować oddzielnie za pomocą 5 ml metanolu wg punktu 5.4. i wytrząsarki wg punktu 6.9. Ekstrakty rozcieńczyć dziesięciokrotnie metanolem i wymieszać. Roztwory poddać analizie chromatograficznej. Ilość substancji ozna-

czonych w ekstrakcie drugiego filtra, nie powinna być większa niż 10% ilości tego związku oznaczonej w ekstrakcie pierwszego filtra. W przeciwnym razie wynik należy traktować jako orientacyjny. W przypadku próbek, których wartości pól powierzchni analizowanych pików przekraczają zakres roboczy metody, należy wykonać powtórne oznaczenie, rozcieńczając dodatkowo próbkę. Dodatkowe rozcieńczenie należy uwzględnić w obliczeniach.

11. Obliczanie wyniku oznaczania

Stężenie difenyloaminy (X) w badanym powietrzu obliczyć w miligramach na metr sześcienny na podstawie wzoru:

$$X = \frac{m_1 + m_2}{V},$$

w którym:

- m_1 – zawartość difenyloaminy na pierwszym filtrze odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- m_2 – zawartość difenyloaminy na drugim filtrze odczytana z krzywej wzorcowej, w miligramach,
- V – objętość przepuszczonego powietrza, w metrach sześciennych.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując: chromatograf cieczowy, firmy Waters Alliance 2695 wyposażony w pompę poczwórną, termostat, detektor Waters PDA 2996 i detektor spektrofluorymetryczny Waters 2475, automatyczny dozownik próbek i komputer z programem sterowania i zbierania danych oraz kolumnę analityczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące dane walidacyjne:

- zakres pomiarowy 0,0008 ÷ 0,032 mg/ml
0,4 ÷ 16 mg/m³ (dla próbki powietrza 100 l)
- granica oznaczania ilościowego, X_{ozn} 0,02 µg/ml (UV-VIS);
0,00026 µg/ml (FLD)

- granica wykrywalności 0,006 µg/ml (UV-VIS);
0,00008 µg/ml (FLD)
- współczynnik korelacji charakteryzujący liniowość krzywych wzorcowych: $r = 0,999$ (UV-VIS);
 $r = 0,999$ (FLD)
- całkowita precyzja badania, V_c , 5,6%
- niepewność całkowita metody 13,8%.